

## Aktivitas Kitinase dan Peroksidase dari Ekstrak Kasar Protein Asal Kalus dan Berbagai Jaringan Tanaman *Trichosanthes cucumerina* var. *anguina*

### *Chitinase and Peroxydase Activities of Crude Protein Extracts from Callus and Trichosanthes cucumerina var. anguina Tissues*

Dewi Sukma<sup>1\*</sup>, Roedhy Poerwanto<sup>1</sup>, Sudarsono<sup>1</sup>, Nurul Khumaida<sup>1</sup>, I Made Artika<sup>2</sup>, dan Suryo Wiyono<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Agathis, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

<sup>3</sup>Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Kamper, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 1 Agustus 2012/Disetujui 21 November 2012

#### ABSTRACT

*Chitinase and peroxydase are important bioactive proteins or are specific enzymes that are related to plant resistance to pathogens. The aims of the research were to analyze the chitinase and peroxidase activities of crude protein extract from calli, stem, leaves and roots of T. cucumerina var. anguina. In the first experiment, chitinase and peroxydase activities were analyzed from in vitro calli, leaves and roots obtained from 2-month-old of field grown plants. The media for calli induction were Murashige and Skoog medium with addition of 1  $\mu$ M NAA + 1  $\mu$ M BA, 2  $\mu$ M NAA + 2  $\mu$ M BA, 3  $\mu$ M NAA + 3  $\mu$ M BA, or 4  $\mu$ M NAA + 4  $\mu$ M BA. In the second experiment, the chitinase and peroxydase activities from crude protein extract of roots, stems and leaves were analyzed. The extracts were from 3-week-old seedling (less than a month), 1-month and 2-month-old plants. The first and the second experiment results showed that crude protein extracts of plant roots from the field grown plants had the highest chitinase and peroxidase activities. Stem of field grown plants had the similar level of chitinase activities with the plant roots. Chitinase activities of in vitro calli were not significantly different from those of plant roots so that it could be used as an alternative for plant roots in studying chitinase from T. cucumerina var. anguina. Chitinase activities in crude protein extracts of roots appeared constant whereas peroxidase tend to increase with plant age.*

**Keywords:** calli, enzyme activities, leaves, roots, stem

#### ABSTRAK

*Kitinase dan peroksidase merupakan protein bioaktif atau enzim spesifik untuk ketahanan tanaman terhadap patogen. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas kitinase dan peroksidase pada ekstrak kasar protein dari kalus, batang, daun dan akar tanaman Trichosanthes cucumerina var. anguina. Pada percobaan pertama aktivitas kitinase dan peroksidase dianalisis dari kalus in vitro, daun dan akar tanaman berumur 2 bulan di lapangan. Media untuk induksi kalus adalah media Murashige dan Skoog dengan penambahan 1  $\mu$ M NAA + 1  $\mu$ M BA, 2  $\mu$ M NAA + 2  $\mu$ M BA, 3  $\mu$ M NAA + 3  $\mu$ M BA, atau 4  $\mu$ M NAA + 4  $\mu$ M BA. Pada percobaan kedua, aktivitas kitinase dan peroksidase dianalisis pada ekstrak kasar protein dari tanaman di lapangan (daun bibit berumur 3 minggu atau < 1 bulan, tanaman berumur 1 bulan dan 2 bulan). Hasil percobaan pertama dan kedua menunjukkan bahwa aktivitas kitinase dan peroksidase tertinggi ditemukan pada akar tanaman dari lapangan. Batang tanaman dari lapangan memiliki aktivitas kitinase yang tidak berbeda nyata dengan akar. Aktivitas kitinase dari ekstrak kasar protein dari kalus tidak berbeda nyata dengan akar sehingga kalus dapat digunakan sebagai bahan alternatif untuk studi kitinase dari T. cucumerina var. anguina. Aktivitas kitinase pada ekstrak kasar protein dari akar tanaman cenderung konstan sedangkan aktivitas peroksidase cenderung meningkat dengan bertambahnya umur tanaman.*

**Kata kunci:** akar, aktivitas enzim, batang, daun, kalus

\* Penulis untuk korespondensi. e-mail: [dsukma70@yahoo.com](mailto:dsukma70@yahoo.com)

## PENDAHULUAN

*Trichosanthes* merupakan salah satu genus dalam famili *Cucurbitaceae* dengan spesies antara lain *T. triduspidata*, *T. cucumerina*, *T. quinquangulata* dan *T. kirilowii*. *Trichosanthes cucumerina* var. *anguina* di beberapa daerah di Indonesia dikenal dengan nama lokal 'pare belut/pare ular' dan dibudidayakan untuk diambil buahnya sebagai sayuran. Berbagai spesies dari famili *Cucurbitaceae* dilaporkan menghasilkan protein bioaktif yang disebut *ribosome inactivating protein* (RIPs). RIPs yang dijumpai pada jaringan tanaman *Cucurbitaceae* antara lain *momordin* pada paria (*Momordica charantia*) (Dong *et al.*, 1994), *luffin* pada blestru (*Luffa cylindrica* L.) (Toppi *et al.*, 2006), *trichosanthin* pada *Trichosanthes kirilowii* var. *japonicum* Kitam (Savary dan Flores, 1994; Kondo *et al.*, 1995), *trichoanguina* pada *Trichosanthes anguina* (Chow *et al.*, 1996) dan RIP dari *Cucurbita moschata* (Barbieri *et al.*, 2006). RIPs berfungsi sebagai salah satu mekanisme defensif bagi tanaman karena RIP memiliki aktivitas anticendawan, antibakteri bahkan antivirus (Roberts dan Selitrennikof, 1986; Leah *et al.*, 1991).

Protein atau enzim lain yang berhubungan dengan respon ketahanan tanaman terhadap patogen adalah kitinase dan peroksidase. Sekuen asam amino dari enzim kitinase (EACHIII) asal *T. kirilowii* pernah dilaporkan oleh Savary dan Flores (1994). Kitinase dapat mendegradasi senyawa kitin, penyusun dinding sel cendawan, dengan menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4-*glycoside* pada biopolymer *N-acetylglucosamine* dalam senyawa tersebut (Kasprezewska, 2003). Peroksidase merupakan enzim yang terlibat dalam respon tanaman terhadap patogen dan termasuk ke dalam PR-9 (Lagrimini *et al.*, 1997). Oku (1994) menyatakan bahwa peroksidase berperan dalam proses oksidasi dan polimerisasi prekursor untuk biosintesis lignin. Lignin berfungsi sebagai barier fisik yang dapat menghambat infeksi patogen pada tanaman. Peroksidase juga menunjukkan penghambatan terhadap pertumbuhan cendawan dalam pengujian *in vitro* (Saikia *et al.*, 2006). Aktivitas peroksidase yang tinggi pada tanaman terkait dengan ketahanan yang lebih tinggi terhadap patogen seperti yang pernah dilaporkan pada kacang tanah (Pujihartati *et al.*, 2006a).

Peroksidase banyak digunakan dalam industri dan aplikasi analitik, antara lain sebagai *reagen* dalam diagnosis klinik dan enzim immunoassay (Agostini *et al.*, 2002). Peroksidase juga dapat digunakan untuk perlakuan limbah air yang mengandung fenol dan amina aromatik (Klibanov *et al.*, 1981; Wu *et al.*, 1998), untuk proses *biobleaching*, proses degradasi lignin, produksi bahan kimia dan bahan bakar dari *pulp* kayu, produksi alkaloid dimerik, serta oksidasi dan biotransformasi senyawa organik (Ryan *et al.*, 1994). Peroksidase sudah diproduksi secara komersial dari tanaman *horseradish* (*Armoracia* sp.) (Krell, 1991). Melihat luasnya potensi pemanfaatan peroksidase, maka perlu diteliti potensi tanaman lain termasuk *Trichosanthes* dalam menghasilkan peroksidase.

Aktivitas kitinase dan peroksidase pada berbagai jaringan tanaman *T. cucumerina* var. *anguina* belum pernah

diteliti. Oleh sebab itu percobaan pada tanaman *T. cucumerina* var. *anguina* dilakukan dengan tujuan (1) menganalisis aktivitas kitinase dan peroksidase dari ekstrak kasar protein kalus, akar dan daun serta (2) membandingkan aktivitas kitinase dari ekstrak kasar protein akar, batang dan daun asal umur tanaman yang berbeda. Hasil percobaan diharapkan dapat memberikan informasi bagian tanaman yang memiliki aktivitas kitinase dan peroksidase paling tinggi sehingga untuk penelitian selanjutnya yang berhubungan dengan enzim kitinase dan peroksidase dapat difokuskan pada jaringan tertentu dari tanaman.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan Oktober 2007. Lokasi penelitian untuk pembuatan kultur kalus *in vitro* adalah di Laboratorium Bioteknologi Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB dan untuk penyiapan bahan tanaman asal lapangan, dilakukan penanaman di lahan masyarakat di Desa Sinar Sari, Kecamatan Dramaga, Bogor.

*Analisis Aktivitas Enzim Kitinase dan Peroksidase dari Ekstrak Kasar Protein Asal Kalus In Vitro, Daun dan Akar Tanaman T. cucumerina var. anguina*

Kalus *in vitro* diinduksi dalam media MS dengan perlakuan 4 taraf NAA dan BA yaitu MS + 1  $\mu$ M NAA + 1  $\mu$ M BA; MS + 2  $\mu$ M NAA + 2  $\mu$ M BA; MS + 3  $\mu$ M NAA + 3  $\mu$ M BA; dan MS + 4  $\mu$ M NAA + 4  $\mu$ M BA. Eksplan yang digunakan dalam induksi kalus adalah potongan batang bibit *T. cucumerina* var. *anguina* berumur 2 minggu yang dikecambahkan dalam media MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh *in vitro*. Potongan eksplan berukuran  $\pm 1$  cm ditanam dalam media perlakuan induksi kalus, dan kultur dipelihara dalam ruangan bersuhu 22-24 °C dalam kondisi gelap 24 jam. Kalus yang sudah terbentuk pada umur 4 minggu setelah tanam (MST) selanjutnya dipanen, ditimbang bobot segarnya dan dilakukan ekstraksi kasar protein.

Daun dan akar tanaman dari lapangan diambil dari tanaman asal benih yang sudah berbuah berumur 2 bulan setelah tanam. Tanaman ditanam dalam *polybag* berukuran 40 cm x 40 cm dengan media campuran tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 1:1 (v/v). Daun yang diambil adalah daun yang sehat tidak menunjukkan gejala serangan penyakit serta sudah berkembang sempurna (daun dewasa). Akar yang digunakan untuk analisis adalah akar primer, sekunder maupun tertier (akar serabut).

Untuk ekstraksi protein, jaringan tanaman sebanyak 0.5 g segar, digerus dalam larutan penyangga fosfat (50 mM, pH 7) dingin dengan perbandingan 1:4 (b/v). Ekstraksi protein dari semua jaringan dilakukan dalam kondisi lingkungan yang bersuhu sekitar 4 °C. Gerusan tanaman disentrifus pada kecepatan 5,000 rpm dan suhu 4 °C selama 10 menit. Supernatan diambil dan ditentukan total protein terlarutnya (TPT) menggunakan metode Lowry *et al.* (1951).

Aktivitas kitinase dalam ekstrak kasar protein dari jaringan tanaman yang dianalisis ditentukan berdasarkan kemampuannya untuk mendegradasi substrat dimer p-nitrophenil N-asetil  $\beta$ -D glucosaminide (pNP-NacGluc) mengikuti metode yang digunakan oleh Pujihartati *et al.* (2006b). Sebanyak 100  $\mu$ L supernatan hasil ekstrak kasar protein dicampur dengan 10  $\mu$ L substrat pNP-NacGluc 5 mM, divorteks, lalu diinkubasi selama 0 dan 3 jam. Setelah diinkubasi, reaksi dihentikan dengan penambahan *Trichloroacetic Acid* (TCA) 20% sebanyak 125  $\mu$ L, divorteks lalu disentrifus pada 5,000 rpm selama 5 menit. Supernatan hasil sentrifus diambil sebanyak 0.3 mL dan ditambahkan 0.7 mL NaOH 0.5 mM. Selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit dan nilai absorbansi larutan sesudah reaksi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 405 nm. Aktivitas kitinase dihitung sebagai banyaknya pNP NacGluc (mM) yang dibebaskan per jam per mg protein (mM pNP jam<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>).

Aktivitas enzim peroksidase dari ekstrak kasar protein dari bagian tanaman yang dianalisis ditentukan dengan metode yang digunakan Kar dan Mishra (1976). Sebanyak 100  $\mu$ L ekstrak kasar protein dari jaringan yang diuji ditambahkan ke dalam larutan 2.5 mL pirogalol 0.2 M. Selanjutnya ke dalam campuran ditambahkan 250  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%). Nilai absorbansi larutan sesudah reaksi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang  $\lambda$  420 nm setiap 30 detik dalam periode 0-150 detik, dengan menggunakan blanko campuran larutan yang sama tetapi tanpa ekstrak kasar protein. Sebagai ganti ekstrak kasar protein, ke dalam larutan blanko ditambahkan larutan penyangga fosfat. Aktivitas peroksidase dihitung sebagai peningkatan nilai absorbansi per satuan waktu per bobot protein ( $\Delta A_{420}$  menit<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>) pada kondisi analisis.

*Analisis Aktivitas Kitinase dan Peroksidase pada Ekstrak Kasar Protein Akar, Batang dan Daun Tanaman T. cucumerina var. anguina dari Lapang pada Berbagai Umur Tanaman*

Bahan tanaman yang digunakan terdiri atas tanaman berumur 3 minggu setelah berkecambah (3 MSB), tanaman berumur 1 bulan setelah ditanam (1 BST) atau 7 MSB dan tanaman berumur 2 BST atau 11 MSB. Benih ditanam di bak pembibitan dan dipanen pada umur 3 minggu setelah

perkecambahan untuk tanaman 3 MSB. Untuk tanaman 1 dan 2 BST, bibit dipindah ke *polybag* berukuran 40 cm x 40 cm dengan media campuran tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 1:1 (v/v) dan tanaman dipanen akar, batang, dan daunnya pada umur 1 dan 2 BST.

Ekstrak kasar protein, penetapan kadar protein, analisis aktivitas kitinase dan peroksidase dari ekstrak kasar protein dilakukan dengan metode seperti pada Percobaan 1. Data hasil pengamatan pada percobaan 1 dan 2 dianalisis ragam dan pada perlakuan yang berpengaruh nyata dilakukan uji lanjut dengan uji jarak berganda Duncan (DMRT) dengan  $\alpha = 5\%$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

*Analisis Aktivitas Enzim Kitinase dan Peroksidase dari Ekstrak Kasar Protein Asal Kalus In Vitro, Daun dan Akar Tanaman T. cucumerina var. anguina.*

Kalus dapat dihasilkan pada empat komposisi media yang diuji (MS + 1  $\mu$ M NAA + 1  $\mu$ M BA; MS + 2  $\mu$ M NAA + 2  $\mu$ M BA; MS + 3  $\mu$ M NAA + 3  $\mu$ M BA; MS + 4  $\mu$ M NAA + 4  $\mu$ M BA), namun sebagian besar kalus pada media MS + 2  $\mu$ M NAA + 2  $\mu$ M BA terkontaminasi pada minggu ke-2 sehingga pengamatan tidak dapat dilanjutkan. Bobot kalus yang dihasilkan pada media MS + 1  $\mu$ M NAA + 1  $\mu$ M BA, MS + 3  $\mu$ M NAA + 3  $\mu$ M BA atau MS + 4  $\mu$ M NAA + 4  $\mu$ M BA, tidak berbeda nyata dengan rata-rata bobot kalus per eksplan sekitar 0.64-1.14 g. Kalus pada media MS + 1  $\mu$ M NAA + 1  $\mu$ M BA berwarna kecoklatan sementara pada media MS + 3  $\mu$ M NAA + 3  $\mu$ M BA atau MS + 4  $\mu$ M NAA + 4  $\mu$ M BA berwarna putih dan kecoklatan pada beberapa bagiannya.

Jenis bahan tanaman berpengaruh nyata terhadap total protein terlarut dan kadar protein jaringan dari ekstrak kasar protein (Tabel 1). Total protein terlarut dari daun nyata lebih tinggi dibandingkan pada akar maupun kalus. Total protein terlarut pada kalus dari ke-3 media yang digunakan tidak berbeda nyata. Total protein terlarut pada akar tidak berbeda nyata dengan total protein terlarut pada kalus, kecuali pada kalus dari media MS + 3  $\mu$ M NAA + 3  $\mu$ M BA. Kadar protein jaringan dan persentase protein pada berbagai jaringan mengikuti pola total protein terlarut, yaitu tertinggi pada daun tanaman (20.69 mg g<sup>-1</sup> bobot segar daun atau sekitar

Tabel 1. Total protein terlarut dan kadar protein dari kalus *in vitro*, daun dan akar tanaman dari lapang tanaman *T. cucumerina* var. *anguina*

Bahan tanaman	Total protein terlarut (mg mL <sup>-1</sup> )	Kadar protein jaringan (mg g <sup>-1</sup> bobot segar)	Protein (%)
Kalus dari media MS + 1 $\mu$ M NAA + 1 $\mu$ M BA	1.29bc	5.18bc	0.52
Kalus dari media MS + 3 $\mu$ M NAA + 3 $\mu$ M BA	1.76b	7.07b	0.71
Kalus dari media MS + 4 $\mu$ M NAA + 4 $\mu$ M BA	0.99bc	3.96bc	0.40
Daun tanaman dari lapang	5.17a	20.69a	2.07
Akar tanaman dari lapang	0.44c	1.78b	0.18

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf  $\alpha = 5\%$

2%) dan terendah adalah pada akar tanaman dari lapangan (1.78 mg g<sup>-1</sup> bobot segar atau sekitar 0.18%). Kadar protein jaringan dan persentase protein pada kalus tidak berbeda nyata dengan akar.

Aktivitas kitinase dan peroksidase dari ekstrak kasar protein kalus, daun dan akar tanaman disajikan pada Tabel 2. Aktivitas kitinase paling tinggi ditemukan pada akar tanaman dari lapangan dengan nilai yang nyata lebih tinggi dibanding dari daun, namun tidak berbeda nyata dengan kalus. Aktivitas kitinase pada kalus dari media MS + 1  $\mu$ M NAA + 1  $\mu$ M BA, MS + 3  $\mu$ M NAA + 3  $\mu$ M BA atau MS + 4  $\mu$ M NAA + 4  $\mu$ M BA tidak berbeda nyata satu sama lain menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi NAA dan BA dalam media tidak mempengaruhi aktivitas kitinase dari kalus *T. cucumerina* var. *angina*. Jenis jaringan berpengaruh nyata terhadap aktivitas peroksidase dari ekstrak kasar protein tanaman. Aktivitas peroksidase paling tinggi ditemukan pada akar tanaman dari lapangan dan paling rendah pada daun tanaman. Aktivitas peroksidase dari akar mencapai 19 kali lipat aktivitas peroksidase dari daun. Aktivitas peroksidase dari kalus dari ketiga komposisi media yang diuji dan aktivitas peroksidase dari daun tanaman tidak berbeda nyata satu sama lainnya.

Ekstrak kasar protein asal kalus *in vitro* juga menunjukkan aktivitas kitinase meskipun lebih rendah dibanding akar tanaman dari lapang. Perbedaan konsentrasi auksin dan sitokinin pada media kalus tidak mempengaruhi aktivitas kitinase dan peroksidase dari ekstrak protein asal kalus. Hasil tersebut berbeda dengan yang dilaporkan Hughes dan Dickerson (1991) tentang terjadinya peningkatan aktivitas kitinase dan glukonase oleh perlakuan auksin IAA pada *Phaseolus vulgaris* dan Barwe *et al.* (2001) yang menunjukkan bahwa BA dapat menginduksi peningkatan aktivitas kitinase pada kotiledon kecambah ketimun. Perbedaan tersebut kemungkinan disebabkan perbedaan jenis tanaman, jenis jaringan yang dianalisis dan kondisi lainnya yang terkait percobaan pada masing-masing tanaman.

Perbedaan konsentrasi NAA dan BA dalam media terlihat mempengaruhi morfologi kalus, yaitu pada konsentrasi NAA dan BA yang rendah (1-2  $\mu$ M) kalus lebih cepat mengalami pencoklatan. Hal yang sama juga ditemukan pada kalus tanaman *T. tricuspidata* (Sukma *et al.*, 2008) dan kemungkinan sel-sel pada kalus sudah

mulai mengalami penuaan atau mendekati senesen karena menurun ketersediaan NAA dan BA dalam media dengan bertambahnya umur kultur sehingga tidak dapat mempertahankan multiplikasi sel ataupun sifat meristematik sel kalus dibanding media dengan konsentrasi NAA dan BA yang lebih tinggi (3-4  $\mu$ M).

#### *Aktivitas Kitinase dan Peroksidase pada Ekstrak Kasar Protein Asal Akar, Batang dan Daun Tanaman T. cucumerina* var. *angina* dari Lapangan pada Berbagai Umur Tanaman

Rataan nilai total protein terlarut dan kadar protein jaringan (Tabel 3) nyata dipengaruhi oleh umur tanaman dan interaksi antara umur dan jenis jaringan tanaman. Total protein terlarut dan kadar protein jaringan dan persentase protein paling tinggi ditemukan pada daun, diikuti oleh batang dan akar. Total protein terlarut pada batang dan akar tidak berbeda nyata satu sama lainnya. Umur tanaman mempengaruhi nilai total protein terlarut dan kadar protein jaringan dan persentase protein dalam jaringan tanaman yang terlihat dari tingginya total protein terlarut pada tanaman berumur 1 BST dibanding berumur 3 MSB, namun tidak berbeda nyata dengan tanaman berumur 2 BST. Berbagai organ yang dianalisis menunjukkan pola yang berbeda dalam kandungan total protein terlarut dan kadar protein jaringan dengan bertambahnya umur tanaman. Pada Tabel 3 terlihat bahwa daun mengalami peningkatan nilai total protein terlarut dan kadar protein jaringan dengan bertambahnya umur tanaman, sedangkan pada akar dan batang tidak terlihat peningkatan yang nyata dari total protein terlarut dan kadar protein jaringan seiring dengan bertambahnya umur tanaman.

Aktivitas kitinase dan peroksidase dipengaruhi oleh jenis jaringan dan umur tanaman (Tabel 4). Aktivitas kitinase paling tinggi ditemukan pada akar diikuti oleh batang dan yang paling rendah pada daun. Aktivitas kitinase pada akar dan batang tidak berbeda nyata, namun nyata lebih tinggi dari aktivitas kitinase pada daun. Umur tanaman menyebabkan perbedaan yang nyata dari aktivitas kitinase pada ekstrak kasar protein tanaman dari daun, akar dan batang seperti terlihat pada Tabel 4. Aktivitas kitinase pada akar tanaman nyata meningkat pada tanaman berumur 1 BST. Aktivitas kitinase pada batang dan daun tidak meningkat nyata dengan bertambahnya umur tanaman.

Tabel 2. Aktivitas kitinase dan peroksidase pada berbagai jaringan tanaman *T. cucumerina* var. *angina*

Bahan tanaman	Aktivitas kitinase (mM pNp jam <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein)	Aktivitas peroksidase ( $\Delta$ 420 menit <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein)
Kalus dari media MS + 1 $\mu$ M NAA + 1 $\mu$ M BA	4.03a	0.10b
Kalus dari media MS + 3 $\mu$ M NAA + 3 $\mu$ M BA	2.66ab	0.10b
Kalus dari media MS + 4 $\mu$ M NAA + 4 $\mu$ M BA	6.03a	0.16b
Daun tanaman dari lapang	0.21b	0.05b
Akar tanaman dari lapang	7.70a	0.96a

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf  $\alpha = 5\%$

Berdasarkan hasil percobaan 1 dan 2, ditemukan bahwa total protein terlarut, kadar protein jaringan dan persentase protein paling tinggi pada tanaman ditemukan pada jaringan daun tanaman. Total protein yang tinggi pada daun kemungkinan disebabkan peran utama daun untuk proses fotosintesis, metabolisme karbohidrat, proses sintesis dan metabolisme senyawa-senyawa penting lainnya yang melibatkan banyak protein atau enzim-enzim. Sebaliknya aktivitas kitinase dan peroksidase pada percobaan 1 dan 2 secara konsisten ditemukan paling tinggi pada akar tanaman.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas kitinase pada *T. cucumerina* var. *anguina* dapat ditemui pada tingkat organisasi sel yang paling rendah hingga organ tanaman yaitu kalus, batang, daun dan akar tanaman. Perbedaan tingkat aktivitas kitinase dari organ atau jaringan yang berbeda menunjukkan bahwa aktivitas kitinase bersifat *organ-dependent*. Hal ini juga pernah dilaporkan oleh Samac *et al.* (1990) pada tanaman *Arabidopsis thaliana*, dimana ekspresi gen *basic chitinase* pada akar mencapai

10 kali lipat dari ekspresi pada daun, menunjukkan adanya perbedaan tingkat ekspresi gen pada jaringan tanaman yang berbeda. Sementara Khan (2002) menemukan perbedaan aktivitas kitinase dari berbagai jaringan tanaman *strawberry* dan yang paling tinggi ditemukan pada tajuk (*crown*). Pada *Arabidopsis thaliana* ekspresi isozim *basic chitinase* bersifat *age and organ-dependent*. Ekspresi famili gen tersebut paling tinggi pada akar dan makin meningkat pada tanaman tua (tanaman umur 36 hari memiliki ekspresi gen yang lebih tinggi dari tanaman berumur 26 hari) (Samac *et al.*, 1990).

Pengamatan morfologi dan pertumbuhan tanaman di lapangan (data tidak disajikan) menunjukkan bahwa bagian daun tanaman *T. cucumerina* merupakan bagian yang banyak mengalami serangan penyakit disebabkan patogen cendawan, sebaliknya tanaman yang mengalami penyakit karena patogen yang menyerang batang maupun akar jarang ditemukan. Kondisi demikian memberikan indikasi bahwa ketahanan batang dan akar terhadap patogen kemungkinan lebih baik dibanding daun tanaman disebabkan aktivitas enzim terkait ketahanan terhadap patogen di antaranya

Tabel 3. Total protein terlarut dan kadar protein jaringan pada akar, batang dan daun *T. cucumerina* var. *anguina* dari berbagai umur tanaman di lapang

Jenis Jaringan	Umur tanaman		
	3 MSB	1 BST	2 BST
..... Total protein terlarut (mg mL <sup>-1</sup> ) .....			
Akar	0.65c	0.23c	0.20c
Batang	0.48c	0.37c	0.48c
Daun	3.99b	7.06a	8.03a
..... Kadar protein jaringan (mg g <sup>-1</sup> bobot segar) .....			
Akar	2.59c	0.91c	0.82c
Batang	1.93c	1.46c	1.90c
Daun	15.98b	28.20a	32.11a

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf  $\alpha = 5\%$ ; MSB = minggu setelah berkecambah; BST = bulan setelah tanam

Tabel 4. Aktivitas kitinase dan peroksidase pada ekstrak protein akar, batang dan daun tanaman *T. cucumerina* var. *anguina* pada berbagai umur tanaman di lapang

Jenis jaringan	Umur tanaman		
	3 MSB	1 BST	2 BST
..... Aktivitas kitinase (mM pNp jam <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein) .....			
Akar	2.82b	5.36a	6.16a
Batang	2.89b	4.44ab	3.87ab
Daun	0.37c	0.16c	0.12c
..... Aktivitas peroksidase ( $\Delta 420$ menit <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein) .....			
Akar	0.26b	4.19a	2.16a
Batang	0.17b	0.26b	0.24b
Daun	0.02b	0.05b	0.05b

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf  $\alpha = 5\%$ ; MSB = minggu setelah berkecambah; BST = bulan setelah tanam

kitinase dan peroksidase yang lebih tinggi (36 kali dan 19 kali lipat dibanding daun) pada akar tanaman. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Rubiyo *et al.* (2010) yang menunjukkan bahwa pada kakao, aktivitas kitinase dan peroksidase yang tinggi ditemukan pada ekstrak protein daun dari klon yang tahan penyakit yang disebabkan cendawan *Phytophthora palmivora*.

Percobaan 2 memperlihatkan bahwa umur tanaman *T. cucumerina* var. *anguina* memiliki pengaruh yang berbeda terhadap aktivitas kitinase dan peroksidase dari ekstrak kasar protein asal akar, batang dan daun. Hasil ini mengindikasikan bahwa aktivitas kitinase dan peroksidase pada jaringan tanaman dipengaruhi jenis jaringan dan umur tanaman (*age and organ dependent*). Selain faktor *age and organ dependent*, berbagai faktor lain dapat mempengaruhi aktivitas peroksidase seperti adanya cekaman dari lingkungan (biotik maupun abiotik, bahkan cekaman fisik seperti adanya angin) (Cippolini, 1998). Aktivitas peroksidase sering digunakan sebagai marka untuk respon tanaman terhadap cekaman (Evers *et al.* 1997). Demikian juga dengan kitinase, ekspresinya dipengaruhi oleh cekaman biotik dan abiotik, dan oleh fitohormon meliputi etilen, asam salisilat, asam jasmonat (Kasprezewska, 2003). Dalam penelitian ini, kalus berada dalam kondisi yang relatif tidak mengalami cekaman, sebaliknya tanaman di lapangan kemungkinan mengalami cekaman biotik maupun abiotik. Tingginya aktivitas kitinase dan peroksidase pada akar menunjukkan bahwa bagian tersebut merupakan bagian tanaman yang paling tahan terhadap patogen, sementara itu kalus *in vitro* pada waktu mendarat dapat digunakan untuk mempelajari pengaruh berbagai cekaman biotik dan abiotik terhadap aktivitas kitinase dan peroksidase dari tanaman *T. cucumerina* var. *anguina*.

### KESIMPULAN

Aktivitas kitinase dari tanaman *T. cucumerina* var. *anguina* paling tinggi adalah pada akar dan batang tanaman dan paling rendah pada daun sedangkan aktivitas peroksidase paling tinggi pada akar. Kalus dapat menjadi alternatif untuk mempelajari kitinase dari tanaman *T. cucumerina* karena memiliki aktivitas kitinase dan peroksidase yang tidak jauh berbeda dari akar tanaman dari lapangan. Aktivitas kitinase dan peroksidase pada akar meningkat dengan bertambahnya umur tanaman.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kemendiknas yang telah membiayai penelitian ini dengan dana Hibah Bersaing XIV tahun 2007 dan PERIPI atas bantuan biaya publikasi.

### DAFTAR PUSTAKA

Agostini, E., J. Hernandez-Ruiz, M.B. Arnao, S.R. Milrad, H.A. Tigier, M. Acosta. 2002. A peroxidase

isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35:1-7.

Barbieri, L., L. Polito, A. Bolognesi, M. Ciani, E. Pelosi, V. Farini, A.K.Jha, N. Sharma, J.M. Vivanco, A. Chambery, A. Parente, F. Stirpe. 2006. Ribosome-inactivating proteins in edible plants and purification and characterization of a new ribosome-inactivating protein from *Cucurbita moschata*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1760:783-792.

Barwe, S.P., M. Sathiyabama, C. Jayabaskaran. 2001. Induction of chitinase activity by exogenous cytokinins in excised dark-grown cucumber cotyledones: involvement of staurosporine-sensitive protein kinase (s) in cytokinin signalling. *J. Plant Physiol.* 158:1-7.

Chow, L.P., M. Kamo, J.Y. Lin, S.H. Wang, Y. Ueno, A. Tsugita. 1996. Amino acid sequence of Trichoanguina, a ribosomal inactivating protein from *Trichosanthes anguina* seeds. *J. Biomed. Sci.* 3:178-186.

Cippolini, D.F. 1998. The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical perturbation. *Amer. J. Bot.* 85:1586-1591.

Dong, T.X., T.B. Ng, H.W. Yeung, R.N.S. Wong. 1994. Isolation and characterization of a novel ribosome-activating protein,  $\beta$ -kirilowin, from the seed of *Trichosanthes kirilowii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:387-393.

Evers, D., C. Schmit, Y. Mailliet, J.F. Hausman. 1997. Growth characteristics and biochemical changes of poplar shoots *in vitro* under sodium chloride stress. *J. Plant Physiol.* 151:748-753.

Hughes, R.K., A.G. Dickerson. 1991. Modulation of elicitor induced chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase activity by hormones in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Physiol.* 32:853-861.

Kar, M., D. Mishra. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 57:315-319.

Kasprezewska, A. 2003. Plant chitinases-regulation and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8:809-834.

Khan, A.A. 2002. Characterization of Chitinase Activities, and Cloning, Analysis, and Expression of Gene Encoding Pathogenesis-Related Proteins in Strawberry. Dissertation. Louisiana State University. Louisiana.

- Klibanov, A.M., E.D. Morris. 1981. Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatics amines from water. *Enzyme Microb. Technol.* 3:119-122.
- Krell, H.W. 1991. Peroxidase, an Important enzyme for diagnostic test. p. 469-478. *In* J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel, Th. Gaspar (Eds.). *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidase*. University of Geneva, Geneva.
- Kondo, T., M. Inoue, H. Mizukami, Y. Ogihara. 1995. Cytotoxic activity of bryonolic acid isolated from transformed hairy roots of *Trichosanthes kirilowii* var. *japonica*. *Biol. Pharm. Bull.* 18:726-729.
- Lagrimini, L.M., R.J. Joly, J.R. Dunlap, T.TY. Liu. 1997. The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant Mol. Biol.* 33:887-895.
- Leah, R., H. Tommerup, I. Svendsen, J. Mundy. 1991. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *J. Biol. Chem.* 266:1564-1573.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Oku, H. 1994. *Plant Pathogenesis and Disease Control*. Lewis Pub.-CRC Press, Tokyo.
- Pujihartati, E., Siswanto, S. Ilyas, Sudarsono. 2006a. Aktivitas kitinase pada kacang tanah yang sehat dan yang terinfeksi *Sclerotium rolfsii*. *Hayati* 13:73-78.
- Pujihartati, E., S. Ilyas, Sudarsono. 2006b. Aktivitas pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif, peroksidase, dan kandungan lignin kacang tanah terinfeksi *Sclerotium rolfsii*. *Hayati* 13:166-172.
- Roberts, W., C.P. Selitrennikoff. 1986. Isolation and characterization of two antifungal proteins from barley. *Biochem. Biophys. Acta* 880:161-170.
- Rubiyo, A. Purwantara, Sudarsono. 2010. Aktivitas kitinase dan peroksidase, kerapatan stomata serta ketahanan kakao terhadap penyakit busuk buah. *Pelita Perkebunan* 26:104-114.
- Ryan, O., M.R. Smith, C.O. Faqain. 1994. Horseradish peroxidase: the analyst's friend. *Essays Biochem.* 28:129-146.
- Samac, D.A., C.M. Hironaka, P.E. Yallaly, D.M. Shah. 1990. Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 93:907-914.
- Saikia, R., R. Kumar, D.K. Arora, D.K. Gogoi, P. Azad. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* inducing rice resistance against *Rhizoctonia solani* Folia : production of salicylic acid and peroxidase. *Microbiol.* 51:375-380.
- Savary, B.J., H.E. Flores. 1994. Biosynthesis of defense-related protein in transformed root cultures of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. var. *japonicum* (Kitam). *Plant Physiol.* 106:1195-1204.
- Sukma, D., R. Poerwanto, Sudarsono, N. Khumaida, S. Wiyono, I.M. Artika. 2008. Aktivitas kitinase dan peroksidase dari ekstrak protein daun, akar, kalus dan tunas *in vitro* *Trichosanthes tricuspidata* Lour. *Bul. Agron.* 36:56-63.
- Toppi, L.S., P. Gorini, G. Properzi, L. Barbieri, L. Spano. 2006. Production of ribosome-inactivating protein from hairy root cultures of *Luffa cylindrica* (L.) Roem. *Plant Cell Rep.* 15:910-913.
- Wu, Y., K.E. Taylor, N. Biswas, J.K. Bewtra. 1998. A model for the protective effect of additives on the activity of horseradish peroxidase in removal of phenol. *Enzyme Microb. Technol.* 22:315-322.